



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AMBIENTAL

**“Efecto de la cepa nativa de *P.Fluorescens* en la degradación de cianuro
en solución, in vitro”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL**

AUTOR:

VARGAS ALVAREZ HEYSER JHONATAN

ASESOR:

ING. MISAEL VILLACORTA GONZALEZ

LINEA DE INVESTIGACIÓN:

CALIDAD Y GESTIÓN DE RECURSOS NATURALES

TRUJILLO- PERÚ

2017

JURADO EVALUADOR

Ing. Medardo Alberto Quezada Álvarez
PRESIDENTE

Ing. José Félix Rivero Méndez
SECRETARIO

Ing. Misael Ydilbrando Villacorta González
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios

por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud y fuerzas ya que es mi guía para poder avanzar y seguir encaminándome a lo largo de mi vida, dándome las esperanzas para lograr las metas y proyectos que me he propuesto.

A mis padres

Por los esfuerzos y sacrificios para brindarme una profesión que es la mejor herencia que pudieron darme y haberme apoyado en cada etapa de mi vida, por sus consejos, por la motivación y por el valor mostrado para salir adelante y nunca rendirme, esto me ha permitido llegar a un logro importante de mi vida profesional, por haber hecho de mí una persona de bien. Gracias por su amor eterno.

A mi hijo

Alessandro quien es el motor y motivo de mi vida, por su amor, motivo de mi fortaleza para seguir adelante.

A mis hermanos

Aun siendo menores fueron las personas que me impulsaron a mejorar y aprender, tanto en lo personal, como en lo profesional, dándome los alientos para ser una persona de bien.

A Wendy

Por su profundo amor, gran apoyo, comprensión, paciencia e impulso para alcanzar esta meta. Con todo mi amor, respeto y gratitud eterna.

AGRADECIMIENTO

A Dios, ya que es aquel que cuida mis pasos y me da la oportunidad de luchar por lo que quiero realizar día a día, también por mandarme Alessandro con él a mi lado todo se me hace más fácil y no podía pensar en rendirme.

A mis padres, Nicolas y Violeta, ya que sin duda alguna, fueron las personas que me han apoyado desde inicios de mi etapa estudiantil, hasta mi formación general, aquellas personas que me dieron la oportunidad de ser alguien en la vida e ir mejorando poco a poco, son las personas más importantes en mi vida.

A mis hermanos, Jhordy, Marivi y Rodrigo, por su apoyo, comprensión y compañía en los momentos difíciles.

A Wendy por amarme tanto, por su apoyo, por su compañía, por su comprensión, por su paciencia y por ser un apoyo incondicional.

A mi Asesor Ing. Misael, una persona que me guio desde un inicio y me dio la oportunidad de concluir satisfactoriamente mi tesis.

Finalmente a todas las personas que en algún momento de mi carrera me aconsejaron, me apoyaron y compartieron sus conocimientos.

DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo, Heyser Jhonatan Vargas Alvarez con DNI N° 70224257, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Ambiental, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Asimismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presentan en la tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponde ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, Diciembre del 2017

HEYSER JHONATAN VARGAS ALVAREZ

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado pongo a su consideración la tesis titulada “Efecto de la cepa nativa de *P.Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro” para obtener el título profesional de Ingeniero Ambiental.

El presente proyecto de investigación consta de seis capítulos: Introducción, método, resultados, discusiones, conclusiones y recomendaciones. Donde tiene como objetivo general evaluar el efecto de la cepa nativa de *P.fluorescens* en la degradación de cianuro.

Esta investigación ha llegado a las conclusiones esperadas que estoy muy convencido que permitirán mejorar el tratamiento de cianuro libre, cualquier observación que ustedes realicen a mi proyecto de investigación estoy convencido que será con el afán de poder mejorarlo.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA	10
1.2 TRABAJOS PREVIOS	12
1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA.....	14
1.3.1 Marco Teórico	14
1.3.2 Marco Conceptual	15
1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	19
1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	19
1.6 HIPÓTESIS.....	19
1.7 OBJETIVOS	20
1.7.1. Objetivo General:	20
1.7.2. Objetivo Específicos:	20
II. MÉTODO	21
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	21
2.2. VARIABLES, OPERACIONALIZACIÓN.....	22
2.2.1 VARIABLES	22
2.2.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	22
2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	25
2.4. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	25
2.4.1. Técnica e instrumento de recolección de datos.	25
2.4.2. VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO.....	25
2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS	25
2.6. ASPECTOS ÉTICOS	26
III. RESULTADOS.....	27
IV. DISCUSIÓN.....	33
V. CONCLUSIONES	34
VI. RECOMENDACIONES	35
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35
ANEXOS	40

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación titulada: “Efecto de la cepa nativa de *P. Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro” se evaluó el efecto de la cepa nativa de *P. fluorescens* en la degradación de cianuro. Las cepas de *P. fluorescens* se aislaron de arenas y tierras descartadas del proceso de extracción de oro por cianuración del cerro “El Toro”, Huamachuco. La muestra utilizada fue con una concentración inicial de cianuro libre de 500 ppm, cuya variable de operación fue: concentración de *P. fluorescens* (0, 10, 15, 20 mg/L) en un tiempo de 5 días.

Los resultados mostraron que al aumentar las concentraciones de *P. Fluorescens* hacen que las concentraciones de cianuro libre disminuyan. De esta manera se concluyó que con la concentración de 20 ppm de *P. Fluorescens* se obtuvo una concentración de cianuro libre de 76 ppm lo que representó el 84.80 % de eficiencia.

Palabras Claves: *P. Fluorescens*, Cianuro, degradación, concentración.

ABSTRACT

In the present research project entitled: "Effect of the native strain of *P. Fluorescens* on the degradation of cyanide in solution, in vitro" the effect of the native strain of *P. fluorescens* on the degradation of cyanide was evaluated. Strains of *P. fluorescens* were isolated from sands and discarded lands of the gold extraction process by cyanidation of the hill "El Toro", Huamachuco. The sample used an initial concentration of free cyanide of 500 ppm, whose operating variable was: concentration of *P. fluorescens* (0, 10, 15, 20 mg / L) in a time of 5 days. The results showed that by increasing the levels of *P. Fluorescens*, free cyanide levels decrease. In this way, it was concluded that with the concentration of 20 ppm of *P. Fluorescens*, a free cyanide concentration of 76 ppm was obtained, representing 84.80% efficiency.

Keywords: *P. Fluorescens*, Cyanide, degradation, concentration.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Realidad Problemática

El cianuro es el reactivo químico principal en la extracción y recuperación de metales en la industria minera. Actualmente se genera cerca de 1,4 millones de Tn en el planeta (Logsdon et al., 1999). Citado por TUYA, (2014).

Menciona que en la extracción de oro, el cianuro (CN) es utilizado, generando esté problemas de contaminación en el mundo (Gaviria y Meza, 2006), Citado por CARDONA, (2015).

El uso de cianuro en el proceso de minería provoca un riesgo sobre la salud de las personas y el medio ambiente, siendo esta una sustancia altamente toxica. Las personas aledañas a estas minas se ven amenazados por la utilización de cianuro (ODRIOZOLA, 2003, p. 3)

Por otro lado mencionan que una de las primordiales fuentes de polución por cianuro es la industria minera (WHO, 2004; David et al., 2006). En donde los residuos cianurados son arrojados en fuentes hídricas y suelos reportando desgracias por polución en ecosistemas y poblaciones (Morán, 1998; Gurbuz5A et. al., 2004). Citados por CARDONA, (2015).

El cianuro presente en aguas superficiales provoca envenenamiento de los animales por la exhibición simultánea mediante la inhalación y absorción. Los ríos, lagos y mares contaminados causan destrucción duradera en ciertas especies; las investigaciones toxicológicos han advertido que puede destruir el sistema nervioso, respiratorio y cardiovascular de los animales, también disminuye la creación de productos de mínima toxicidad originando problemas ambientales (Gurbuz et al., 2009; Ramirez, 2010). Citado por CARDONA, (2015)

Según CHUNG, (2008) menciona que el cianuro en sus distintas formas y de grandes cantidades son descargados diariamente en aguas, suelos y aire provocadas por distintos labores industriales como la minería, donde el cianuro es muy importante en el proceso de recuperación de oro. Citado por MORILLO y GUEVARA, (2015).

Según la (UPME, 2017) “Las beneficiadoras del mineral están fabricados cerca de ríos y quebradas [...] con la cianuración utilizada sin ningún control, las personas pueden exponerse al cianuro y provocarles enfermedades incluso puede causar la muerte, el envenenamiento causado por cianuro depende de la cantidad y el tiempo que esté expuesta la persona”

En nuestro país el NaCN era utilizado en unas 30 beneficiadoras de cianuración en la recuperación del oro. En 1994 el MINEM (Ministerio de Energía y Minas) evaluó un aumento de 165 %, entre 1995 y fines del siglo, en la utilización de procesos de cianuración (MINEM, 1996). Citado por TUYA, (2014).

Así mismo BLAS, (2008) Afirma que en nuestro País, el 20 % de la industria minera es informal, lo cual hace que la problemática de la polución por cianuro, mercurio y otros desperdicios tóxicos que se utilizan en la extracción y recuperación de oro se empeore aún más, por el insuficiente control del cumplimiento de las normas que regulen sus usos y emisiones al ambiente, provocando la contaminación al ecosistema. Madre de Dios, La Libertad y Cajamarca son los departamentos más afectados en el País, siendo Madre de Dios la más afectada por la minería informal en un 96%. Citado por MORILLO y GUEVARA, (2015).

La Libertad, no es extraño a las labores mineras por lo que se supone que nuestros ríos, suelo y aire son alterados en su calidad con esta labor. Varias industrias formales dedicadas a la extracción de minerales en nuestra región son: En la provincia de Santiago de Chuco se encuentran las empresas de Barrick, San Simón, Comarsa y Quiruvilca; en Patáz las empresas de Poderosa, Horizonte y Marza y en la provincia de Sánchez Carrión esta las empresas de La Arena y El Toro. Cabe indicar que en el departamento La Libertad, se localizan mineros informales como también los artesanales por lo que en el proceso de lixiviación con cianuro de sodio, para la obtención del mineral, producen daños ambientales a largo o a corto plazo.

En tal sentido el presente proyecto se busca la realización de un método eficaz y rentable para poder tratar el cianuro y disminuir sus concentraciones por

intermedio del efecto de la cepa nativa de *P. Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro.

1.2 Trabajos Previos

Restrepo, Montoya, Muños (2006) en su trabajo titulado “DEGRADACIÓN MICROBIANA DE CIANURO PROCEDENTE DE PLANTAS DE BENEFICIO DE ORO MEDIANTE UNA CEPA NATIVA DE *P. Fluorescens*”, se escogieron 6 plantas de beneficio de oro, se tomaron sus arenas residuales, previamente seleccionadas, las mismas que contenían cantidades de cianuro. Dichas muestras fueron recolectadas en diferentes días de descarga (0, 1, 3, 7 y 14 días). El aislamiento de *P. Fluorescens* se realizó en beakers de 1 L. Seguidamente de haber obtenido algunas cepas nativas de cada una de las plantas de beneficio se procedió a escoger una de ellas, tomando en cuenta el criterio de velocidad de crecimiento, las muestras estuvieron de 100 hasta 1000 ppm de cianuro. De los datos obtenidos mediante los experimentos de biodegradación de cianuro, se llega a determinar que en las primeras 24 horas, el reactor que contiene la mínima cantidad de contaminante se redujo en un 60%, así mismo se infiere que si se aumenta la concentración con una doble cantidad en el segundo reactor, se obtuvo un 14% de degradación. Los reactores con 400 y 500 ppm de cianuro si se biodegradaron en un 50% aproximadamente. Las otras concentraciones se mantuvieron altas durante el mismo tiempo. En el segundo día del proceso, se observa que todos los reactores mantienen la misma concentración que la del día anterior. Es a partir del día tres que en los experimentos, se empieza a percibir una caída significativa en la concentración de cianuro, en los reactores con concentraciones inferiores a 800 ppm de NaCN.

Según MORILLO y GUEVARA, (2015) en su investigación titulada “Degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. a dos temperaturas y tres pH”; Llego a determinar el efecto que causan las temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, 10.5 en la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. La aislación la realizó a partir de lodos activos presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti-Trujillo (Perú). La muestra de lodo activo se obtuvo haciendo uso de un muestreo por conveniencia, la misma que se

sometió a un enriquecimiento en un caldo mínimo de sales con 500 ppm de cianuro de sodio. Para los experimentos se contaron con seis frascos de vidrio conteniendo 100 ml de caldo mínimo de sales con buffer carbonato, 1000 ppm de cianuro de sodio y 4mL de inóculo de *Pseudomonas sp.* a temperaturas de 32 y 36° C en mezcla con los pH 9.5, 10 y 10.5; así también se tuvieron otros seis frascos de vidrio como controles sometiéndolos a las mismas condiciones pero sin inóculo. Los resultados que se obtuvieron datan una máxima degradación de cianuro por *Pseudomonas sp.* a 36°C/pH 9.5 (655ppm) y 32°C/ pH9.5 (648 ppm) así mismo de mínima degradación a 36°C/ pH 10.5 (203 ppm). Así se puede concluir que la combinación de las temperaturas 32 y 36°C con los pH 9.5, 10, 10.5 interviene sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas ps.* por otro lado se llegó a demostrar que las combinaciones de 32 y 36°C con el pH 9.5 son las que favorecen el mismo proceso.

Según Naranjo, Santa María, (2006) en su trabajo de investigación “EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *Pseudomonas fluorescens* PARA LA BIODEGRADACIÓN DE CIANURO EN SOLUCIÓN ACUOSA” lograron determinar la evaluación del actuar de la concentración de cianuro en una solución acuosa con una concentración primaria de 15 ppm utilizando la técnica de inmovilización, para esto se utilizó una cepa de *P. Fluorescens* aislado del lodo procedente de la industria de metales reconocido por Comargo y Ossa (2005) conservados a 4°C en laboratorio. La *P. Fluorescens* se adecua a un medio de 15 ppm de cianuro y 1,2 g/l de caldo nutritivo en buffer carbonato a pH 9,6. En la biodegradación cuantificaron el porcentaje y velocidad de degradación, en dos matrices de inmovilización (agar-agar y alginato de calcio) y a tres diferentes caudales (0,17 mL/s, 0,23 mL/s y 0,29 mL/s). Determinaron que para la evolución de biodegradación de cianuro con células inmovilizadas se generan con la matriz agar-agar y con un caudal de 0,17 mL/s. Concluyeron que el proceso biológico de células inmovilizadas empleando *P. Fluorescens* llega a ser más competitivo comparado con otros tratamientos biológicos.

1.3 Teorías Relacionadas al tema

1.3.1 Marco Teórico

El proceso de cianuración es un método que se viene utilizando desde aproximadamente 100 años en la recuperación de oro, más aun en las minería mediana y grande. En la minería pequeña el uso de este proceso es nuevo ya que algunos materiales no pueden ser concentrados satisfactoriamente por ningún método gravimétrico, en los últimos tiempos la utilización de cianuro se ha difundido demasiado en la minería pequeña de los países andinos (colmenares, 2007, p.2). Citado por MUDARRA, (2016)

La degradación del cianuro por oxidación acelerada puede realizarse por varios métodos, el más conocido y empleado por razones económicas es el proceso con SO₂/aire. Sin embargo, este proceso depende de varios parámetros como pH, concentración de CuSO₄ y otros que son propios del efluente de un lugar específico y cuyos valores son desconocidos. GOLD INSTITUTE, (1996).

Según Restrepo, Montoya, Muños (2006). El cianuro es el más utilizado en la industria minero-metalúrgica en la recuperación de metales preciosos, sin embargo este compuesto ocasiona efectos nocivos, entre los que se resalta su alta toxicidad y su efecto en la respiración celular. En la mayoría de las plantas de tratamiento en la recuperación de metales no se controlan técnicamente los procesos, en donde la utilización de NaCN se utiliza más de lo normal, ocasionando descargas altas tanto en solución como en tierras descartadas de este proceso. Los tratamientos convencionales para degradación de cianuro, pueden ser muy comunes y eficientes, sin embargo presentan desventajas por el costo elevado de los reactivos necesarios. El tratamiento microbiano por su parte, demuestra eliminar grandes cantidades de cianuro de una manera eficiente y económica.

En el Perú las normas ambientales vigentes nos muestran claramente los LMP para la descarga de efluentes líquidos en las actividades minero-metalúrgicas (DS N° 010-2010-MINAM) anexo (Tabla 8).

1.3.2 Marco Conceptual

El Cianuro

Según ALVAREZ, (2005) El concepto cianuro se utiliza para designar a una familia de compuestos químicos, los mismos que se caracterizan por la presencia de un átomo de carbono enlazado a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple ($\text{C}\equiv\text{N}$). En resumen se llama cianuro a una gran variedad de compuestos que contienen este grupo químico. Citado por TUYA, (2014).

Por otro lado SILVESTRE, (2015) El cianuro es un compuesto altamente tóxico debido a que un cambio de pH en el medio puede liberar ácido cianhídrico, compuesto que usualmente es asociado con la máxima toxicidad de estos compuestos. Por sus propiedades químicas, el cianuro es relevante tanto para la industria como para el medioambiente. Su interés industrial es básicamente porque es un fuerte agente ligante en forma iónica, capaz de formar compuestos metálicos estables con la mayoría de metales pesados en bajas concentraciones.

Compuestos del Cianuro: Los diferentes compuestos pueden clasificarse en:

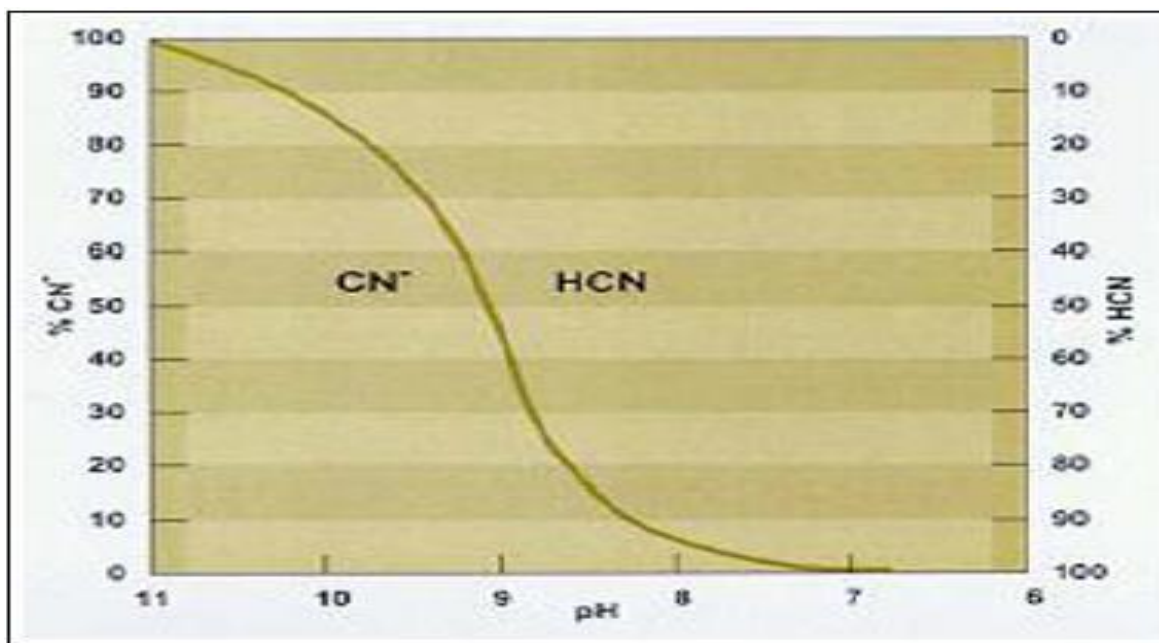
- **Cianuro total**

Este concepto se emplea en los procedimientos analíticos. Se designa cianuro total a todo los compuestos de cianuro presentes en una solución acuosa. El cianuro total contiene cianuro libre, cianuros simples y todos los cianuros complejos, que contienen los cianuros fácilmente disociables en ácido débil (Díaz, 2010, p. 21).

- **Cianuro libre**

Según Díaz (2007, p. 21), el cianuro es el concepto que se utiliza para describir al ion cianuro (CN^-) el cual se disuelve en el agua del proceso así como a cualquier cianuro de hidrógeno (HCN) que se llega a formar en la solución. Las briquetas solidas de cianuro de sodio se diluyen en el agua para dar origen al ion sodio y al anión cianuro; el anión de cianuro se mezcla con el ion hidrógeno para originar el HCN donde la concentración del ion hidrógeno en el agua del proceso dependerá del pH existente en la solución como se puede observar en la figura 1.

En la Figura 1: Equilibrio de pH entre CN^- /HCN



Fuente: Esteban Miguel y Domic Mihovilovic, Hidrometalurgia.

El cianuro libre sucede difícilmente en la naturaleza por la alta reactividad de la molécula.

Métodos de degradación del cianuro

La degradación del cianuro, se atribuye a la transformación de los cianuros simples y libres, en cianuros que no son tóxicos o menos tóxicos, como por ejemplo los complejos, tiocianatos, cianatos, carbonatos u otras sustancias, obedeciendo a la tecnología que se utiliza en remediación.

Existen varios métodos generales los cuales se utilizan para el tratamiento del cianuro, entre ellos tenemos:

Tabla N° 1. Metodos de tratamiento de cianuro

Método General	Técnica particular
Físico	Dilución con uso de membranas, hidrolisis, electrodeposición y destilación.

Formación de complejos	Acidificación, volatilización, adición de metal, flotación y extracción con solvente.
Adsorción	Con minerales, carbón activado y resinas
Oxidación	Bio-oxidación, catalítica, electrolisis, química, fotolisis

Fuente: Muestreo tomado de la Tesis de J. Nazareno en Producción Más Limpia – ESPOL 2003.

Compuestos derivados del Cianuro:

Los principales compuestos afines al cianuro generados como subproductos asociados son:

- **Cianato (CNO^-)**

Es el producto resultante durante el tratamiento de minerales, por la reacción que se genera entre el ion cianuro libre y el ion metálico, un ejemplo es el ion cúprico, o también en el tratamiento de efluentes que contienen cianuro en un agente oxidante como el peróxido de hidrogeno o el ion hipoclorito.

- **TIOCIANATO (SCN^-)**

La presencia de tiocianato (es decir SCN^-) en las disoluciones y efluentes de un proceso obedece a la reacción del cianuro con átomos de azufre inestable, dicha reacción puede suceder mientras ocurre la aireación previa o en la lixiviación.

El tiocianato es un compuesto que es química y biológicamente degradable, siendo los subproductos metabólicos el carbonato, el ion amonio y el sulfato (MAMANI, 2007, p. 31).

Los Tiocianatos son más estables que los cianatos si se les evalúa en una solución acuosa, resultando así ser mucho más resistentes a la fotodescomposición.

- **AMONIO (NH_4^+)**

El cianuro llega a hidrolizarse lentamente en el agua dando lugar a un ion formiato y amonio. Podría generarse cierta hidrolisis de cianuro por ende una formación de amonio mientras se da la cianuración en los niveles de pH habitualmente utilizados (10.5). Sin embargo, la presencia de amoniaco es mucho más probable de suceder en los desechos que contiene cianuro debido a la hidrólisis del cianato.

Pseudomonas Fluorescens.

Son bacterias con forma de bastón, que necesitan oxígeno para vivir. Tienen la capacidad de apresurar la germinación y el crecimiento de las plantas por medio de hormonas, también pueden eliminar sustancias contaminantes para el suelo y el agua.

Generalidades de *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens son bacterias baciliformes, aerobias, las cuales tienen varios flagelos polares. Estas son conocidas por su aptitud de generar el crecimiento de las plantas que viven en contacto con ellas (12). Según su clasificación taxonómica (12) se ubican en:

Tabla N° 2. Generalidades de *P. Fluorescens*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria

Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	Pseudomonas
Especie	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula

Fuente: [www.Pseudomonas Fluorescens/generalidades](http://www.Pseudomonas_Fluorescens/generalidades).

1.4 Formulación del problema

¿Cuál será el efecto de la cepa nativa de *P.fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro?

1.5 Justificación del estudio

El estudio de investigación se justifica porque la minería tiene problemas de contaminación ambiental por el uso inadecuado del cianuro. El estudio pretende demostrar a nivel de laboratorio el efecto de la cepa nativa de *P.Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro.

Así mismo dicho procesamiento posibilitará tener una efectiva degradación de cianuro y a la vez resulte rentable y que las concentraciones se ubiquen por debajo de los límites máximos permisibles, dando lugar a construcción de una escala industrial.

1.6 Hipótesis

H1: La cepa nativa de *P.fluorescens* degrada el cianuro en solución, in vitro.

Ho: La cepa nativa de *P.fluorescens* no degrada el cianuro en solución, in vitro.

1.7 Objetivos

1.7.1. Objetivo General:

Evaluar el efecto de la cepa nativa de *P.fluorescens* en la degradación de cianuro.

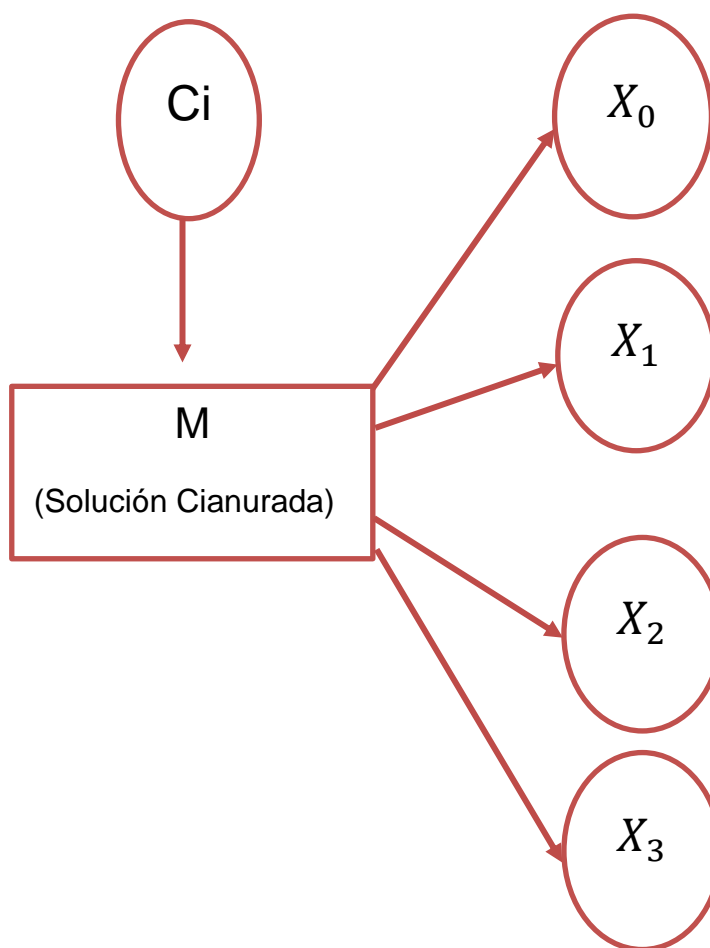
1.7.2. Objetivo Específicos:

- a. Evaluación de la concentración de la solución cianurada antes y después del tratamiento.
- b. Aislamiento e identificación de cepas nativa de *P.fluorescens*.
- c. Aplicación de distintas concentraciones o dosis de la cepa nativa de *P.fluorescens*.

II. MÉTODO

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El diseño de investigación el cual presenta el proyecto de investigación obedece a un diseño cuasi experimental, por lo cual el método para la obtención de datos sería el siguiente:



Ci : Cepa de *P.fluorescens* (i: 1, 2, 3)

Mo : Solución cianurada de concentración constante.

X₀ : Prueba en blanco

X_i : Concentración resultante después del estímulo (i: 1, 2, 3).

Di : Degradación de cianuro (i: 1, 2, 3)

$$D_i = M_0 - X_i$$

Tabla N° 3. Concentraciones, tiempo y degradación

Concentración de <i>P.fluorescens</i> Ci	Concentración de cianuro CN ⁻ (Mo: constante)	Tiempo Días	Concentración Resultante \bar{X}_i	Degradación $D_i = M_0 - \bar{X}_i$
0 ppm	500 ppm	5		
10 ppm	500 ppm	5		
15 ppm	500 ppm	5		
20 ppm	500 ppm	5		

Fuente: Elaboración propia

Se realizara tres replicas por cada concentración de *P.fluorescens* con un tiempo de residencia de cinco (05) días en la solución cianurada, luego del cual se realiza el análisis volumétrico para determinar la cantidad de cianuro presente después del estímulo; luego se calcula la cantidad degradada mediante la fórmula:

$$D_i = M_0 - X_i$$

2.2. VARIABLES, OPERACIONALIZACIÓN

2.2.1 VARIABLES

a. Variable independiente

- Concentración de cepa nativa de *P.fluorescens*

b. Variable dependiente

- Degradación de cianuro.

2.2.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de Medición
Concentración de la cepa nativa de <i>P.Fluorescens</i>	Es una noción que describe a la relación, asociación o proporción que se puede establecer al comparar la cantidad de soluto y el nivel de disolvente presentes en una disolución en donde las bacterias con forma de bastón, necesitan oxígeno y nitrógeno para vivir, adaptadas a resistir y vivir en medios cianurados del cual toman el nitrógeno transformando el HCN y CN- en compuesto menos nocivos.	Las <i>Pseudomonas fluorescens</i> liofilizadas, se pesan en cantidades de 10, 15, 20 mg y se disuelven con agua destilada estéril hasta un litro de solución, obteniendo de esta manera concentraciones de 0, 10, 15 y 20 ppm.	Concentración de la cepa nativa <i>Pseudomonas Fluorescens</i> liofilizada de 0, 10, 15 y 20 ppm	Cuantitativa de razón

Degradación de cianuro.	La degradación del cianuro, hace referencia a la transformación química del HCN y CN-originando nuevas sustancias con propiedades totalmente diferentes, no tóxicas o menos tóxicas.	La degradación de cianuro en solución, 500 ppm, se llevara a cabo con las bacterias <i>Pseudomonas Fluorescens</i> liofilizada que tienen un comportamiento cianotropo y a través una ruta bioquímica transforman el cianuro en amonio, un compuesto nitrogenado fácilmente asimilable, utilizando el Nitrógeno para su crecimiento.	La degradación de la solución cianurada se evaluará antes y después del tratamiento mediante análisis volumétrico y se comparara con la concentración inicial de cianuro $D_i = M_o - X_i$	Cuantitativa de razón
-------------------------	--	--	---	-----------------------

Fuente: elaboración propia

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

- **Población**

La población utilizada fue de 4 litros de 500 ppm de cianuro en solución.

- **Muestra**

La muestra que se utilizó para los análisis de la investigación, fue tomada de la población utilizada 1 litro de la solución de cianuro, la cual se trabajó en laboratorio.

- **Unidad de Análisis**

Concentraciones en mg/L (ppm)

2.4. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

2.4.1. Técnica e instrumento de recolección de datos.

Los datos obtenidos de la presente investigación en el laboratorio, fueron registrados en una tabla (ANEXO 1) y los resultados obtenidos fueron analizados mediante el método estadístico (ANOVA).

2.4.2. Validez y confiabilidad del instrumento.

El instrumento de recolección de datos fue validado por tres expertos con grado de magister o doctor, especialistas técnicos en procesamientos químicos, microbiólogos especialistas en desarrollo de investigación. (ANEXO 2, 3 Y 4)

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Los datos conseguidos del método experimental mediante el análisis volumétrico, se procederán a analizar estadísticamente utilizando la varianza (ANOVA) que permitirá contrastar la hipótesis planteada y así determinar si existe o no efecto de la degradación de cianuro en solución.

2.6. ASPECTOS ÉTICOS

En el presente proyecto de investigación se garantiza que los datos, fuentes y resultados sean confiables, que bajo ninguna circunstancia se incurra a alteración de los mismos.

La información presente en el proyecto será auténtica y veraz.

Los autores que aportan en el proyecto de investigación son citados debidamente de acuerdo con las normas internacionales.

La presente investigación experimental no es plagiada ni copiada total o parcialmente.

III. RESULTADOS



Fig. Nº 2 Aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens*.

En la Fig. Nº 2 Aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens* se observa cómo se logró aislar la cepa *P. Fluorescens* mediante un minucioso proceso de incubación en caldo peptonado, cultivo en agar cetrimide en el centro de innovación tecnológica Moche. (Anexo 8)

En la realización del presente trabajo utilizamos *Pseudomonas Fluorescens* liofilizadas cepa GR-322 con la finalidad de determinar con precisión y exactitud las concentraciones a evaluar en la degradación de cianuro.

Se realizó un análisis volumétrico diario hasta el día cinco, la marcha analítica y resultados de los análisis de degradación de cianuro se muestran. (Anexo 7)

Tabla N° 4. Concentración de cianuro por día

Concentración <i>P.fluorescens</i> Ci	Concentración de cianuro (Mo)	Concentración Resultante \bar{Xi} (ppm)				
días	0	1	2	3	4	5
0 ppm	500 ppm	500	500	500	500	500
10 ppm	500 ppm	486	473	367	328	284
15 ppm	500 ppm	445	420	290	276	108
20 ppm	500 ppm	395	360	203	187	76

En la tabla N° 4 de la concentración de cianuro nos da a conocer que los valores obtenidos mediante el método de titulación volumétrica con concentraciones de 0, 10, 15 y 20 ppm de *P. Fluorescens* dieron un resultado al termino de los 5 días; en el primer día el resultado fue de 500, 486, 445 y 395 ppm de concentración de cianuro, al segundo día presenta un resultado de 500, 473, 420 y 360 ppm de concentración de cianuro, al tercer día se observa un resultado de 500, 367, 290 y 203 ppm de concentración de cianuro, en el cuarto día los resultados obtenidos fueron de 500, 328, 276 y 187 ppm de concentración de cianuro y en el día 5 los resultados son 500, 284, 108 y 76 ppm de concentración de cianuro.

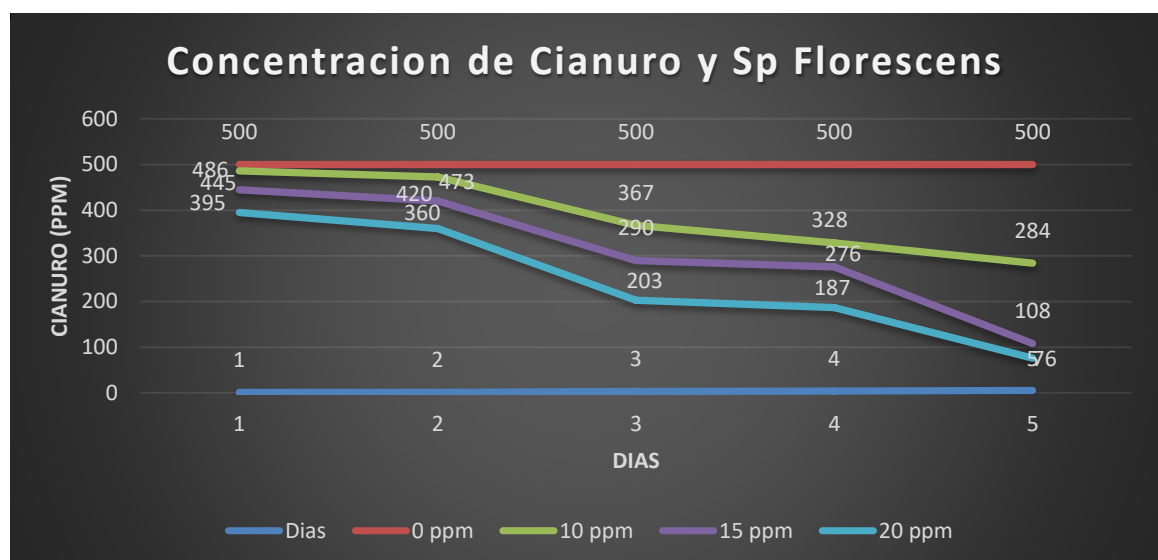


Fig. N° 3. Concentración de Cianuro y *P. Fluorescens*

En la fig. N ° 3 se observa que las concentraciones de cianuro libre disminuyen con el tiempo y así mismo se observa que a mayor concentración de *P. Fluorescens* la disminución de cianuro libre es mayor según como se observa en la Fig. 3.

Tabla N° 5. Degradación porcentual de cianuro

Concentración <i>P.fluorescens</i> Ci	Concentración de cianuro (Mo)	Degradación (%) $Di = \{(Mo - \overline{Xi}) / Mo\} \times 100$ (ppm)				
Días	0	1	2	3	4	5
0 ppm	500 ppm	0	0	0	0	0
10 ppm	500 ppm	2.80	5.40	26.60	34.40	43.20
15 ppm	500 ppm	11.00	16.00	42.00	44.80	78.40
20 ppm	500 ppm	21.00	28.00	59.40	62.60	84.80

En la tabla N° 5 de la Degradación porcentual de cianuro nos da a conocer que el porcentaje de los valores obtenidos en la degradación de cianuro con concentraciones de 0, 10, 15 y 20 ppm de *P. Fluorescens* dieron un resultado rentable al termino de los 5 días; en el primer día el resultado fue de 0, 2.80, 11 y 21 % en la degradación de cianuro, al segundo día presenta un resultado de 0, 6.40, 16 y 28 % en la degradación de cianuro, al tercer día se observa un resultado de 0, 26.60, 42 y 59.40 % en la degradación de cianuro, en el cuarto día los resultados obtenidos fueron de 0, 34.40, 44.80 y 62.60 % en la degradación de cianuro y al termino del día 5 los resultados obtenidos fueron de 0, 43.20, 78.40 y 84.80 ppm de concentración de cianuro.

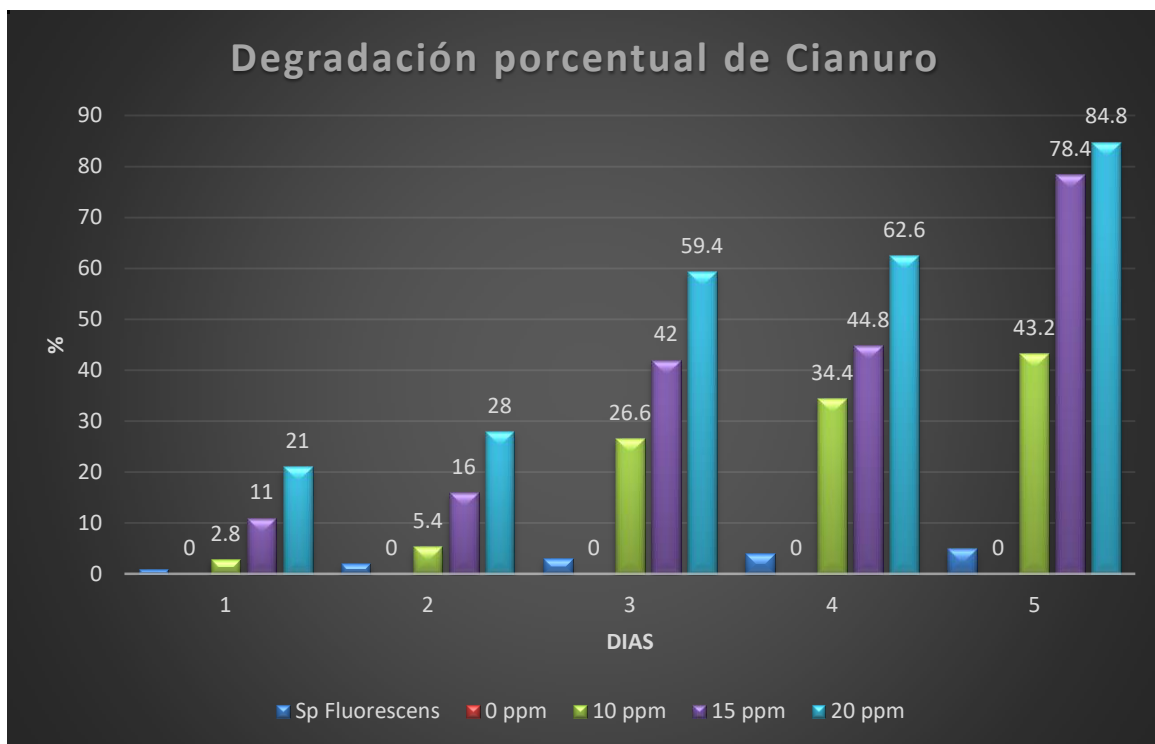


Fig. Nº 4. Degradación porcentual de cianuro

Como podemos observar en la fig. Nº 4 los resultados nos muestra la disminución porcentual de cianuro libre a diferentes concentraciones de *Pseudomonas fluorescens* y a través del tiempo.

Tabla Nº 6. Degradación de cianuro al día 5

Concentración de <i>P.fluorescens</i> Ci	Concentración de cianuro (Mo: constante)	Tiempo Días	Concentración Resultante \bar{Xi} (ppm)	Degradación $Di = Mo - \bar{Xi}$ (ppm)
0 ppm	500 ppm	5	500	0
10 ppm	500 ppm	5	284	216
15 ppm	500 ppm	5	108	392
20 ppm	500 ppm	5	76	424

En la tabla N° 6 de la degradación de cianuro al día 5, nos da a conocer que los valores obtenidos mediante el método de titulación volumétrica con concentraciones de 0, 10, 15 y 20 ppm de *P. Fluorescens* en una concentración inicial de cianuro de 500 ppm, donde al termino de los 5 días los resultados obtenidos en la degradación de cianuro libre son de 0, 216, 392 y 424 ppm.

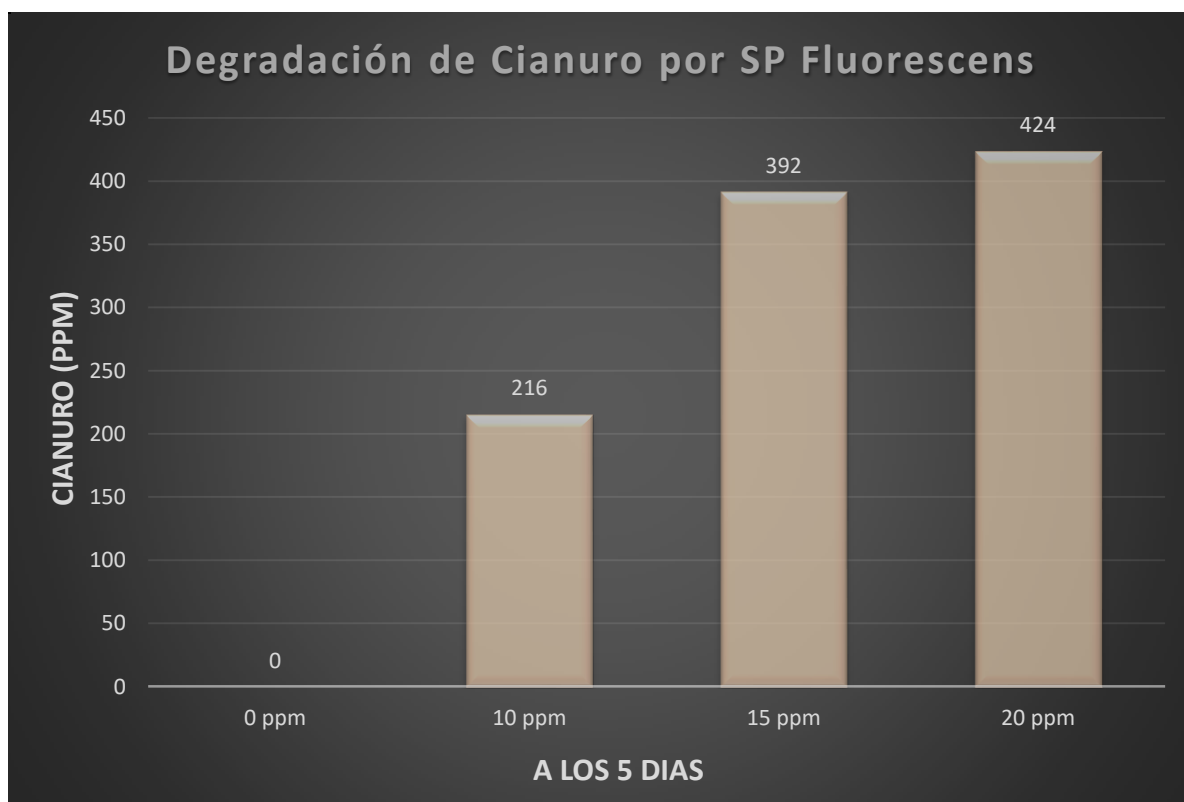


Fig.5. Degradación de cianuro al día 5.

En la figura 5 se observa la concentración y degradación de cianuro al día 5 a diferentes concentraciones siendo la de mayor concentración de *P. Fluorescens* con mayor degradación.

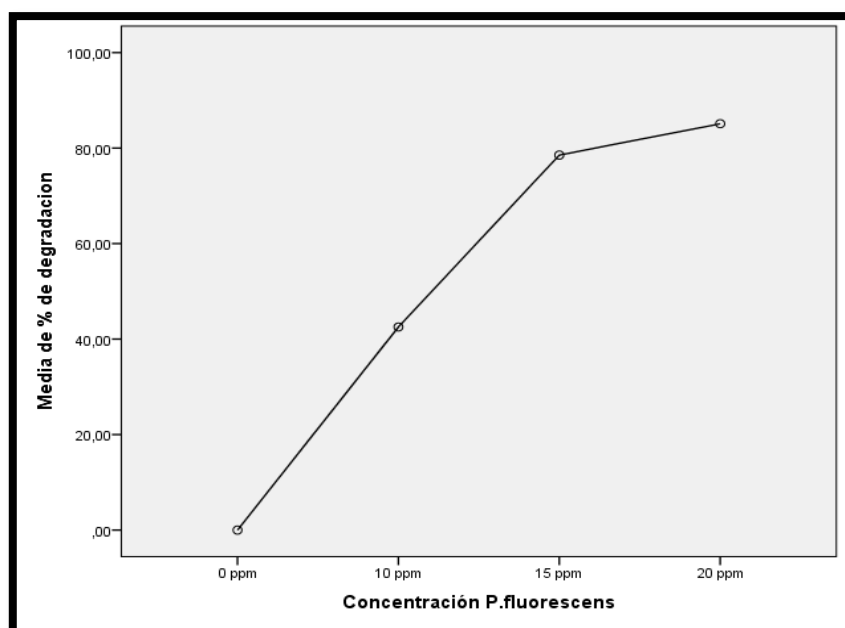


Fig. Nº 6. Análisis estadístico de las medias

Tabla Nº 7 Análisis De Varianza

ANOVA

% de degradación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	13777,216	3	4592,405	4121,830	,000
Dentro de grupos	8,913	8	1,114		
Total	13786,129	11			

En la figura 6, se observa que a mayor concentración de *P. fluorescens* el porcentaje de degradación de cianuro también es mayor.

En la Tabla Nº 7 nos da a conocer que los valores obtenidos del análisis de varianza, evalúan la importancia de uno o más factores, así también nos muestra el valor obtenido de $p < 0.05$ en donde indica que se rechaza la hipótesis negativa y así aceptándose la hipótesis alternativa.

Así también el análisis estadístico indica que la diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05 de confianza. (Anexo 5)

IV. DISCUSIÓN

Como se puede apreciar en la figura N° 6 a mayor concentración de *P.fluorescens*, es mayor el porcentaje de degradación de cianuro, donde ha demostrado un efecto significativo en la degradación de cianuro libre como se observa en la tabla N°6 , coincidiendo con la investigación de Restrepo, (2006) donde nos da a conocer que sus resultados obtenidos en la degradación de cianuro mediante *P.fluorescens* fueron significativos , asimismo según los análisis estadísticos ANOVA se pudo determinar que si existe un efecto significativo como se puede demostrar en la tabla N°7 en donde $p < 0.05$ por lo que se puede afirmar que las concentraciones de *p. fluorescens* influye en la disminución de cianuro .

Para la concentración de la solución cianurada antes y después del tratamiento de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar en la tabla N° 5 que las muestras iniciales con concentración de 500 ppm de cianuro sometida a diferentes concentraciones de *Pseudomonas Fluorescens* (10, 15 y 20 ppm) y una muestra sin concentración de *Pseudomona fluorescens* el cual no presentó ninguna degradación de cianuro al transcurrir el tiempo, en cambio las muestras sometidas a concentraciones de 10, 15 y 20 ppm presento una disminución de cianuro libre conforme avanzaba el tiempo (1, 2, 3 , 4 y 5 días) en un porcentaje de 43.20%, 78.40% y 84.80% al día 5, lo que no concuerda con dicho autor RESTREPO, (2006) en donde sus concentraciones de 400 y 500 ppm de cianuro en las primeras 24 horas se biodegradaron en un 50 % aproximadamente donde su especie bacteriana es más eficiente.

Como se puede observar En la Fig. N° 2 en donde se logró aislar e identificar la cepa *P. Fluorescens* a través de un minucioso proceso de incubación en caldo peptonado, cultivo en agar cetrimide en el centro de innovación tecnológica Moche lo que concuerda en la investigación del autor Montoya, (2006) utilizando la misma metodología para el aislamiento e identificación de la cepa *Pseudomonas fluorescens* en donde nos da

conocer que este es el mejor procedimiento para la identificación de dicha cepa.

Como se puede observar en la tabla N° 6 degradación de cianuro, nos muestra que de las 4 concentraciones de *Pseudomonas Fluorescens* sometidas al tratamiento con concentración de 500 ppm de cianuro y el que obtuvo mayor eficiencia en la degradación fue el tratamiento con concentración de 20 ppm de *Pseudomonas fluorescens*, donde obtuvo un 416 ppm de cianuro libre que equivale a 84.80 % de degradación, concordando con la tesis de investigación del autor Mudarra, (2016) en donde nos da a conocer que a mayor concentración de carbón activado de la cáscara de coco la degradación de cianuro también es mayor.

V. CONCLUSIONES

- Se concluye que la cepa *Ps Fluorescens*, tuvo un efecto significativo en la degradación de cianuro con un porcentaje de degradación 43.20%, 78.40% y 84.80% a concentraciones de *P.fluorescens* de 10,15 y 20 ppm.
- La evaluación de las concentraciones de cianuro antes y después del tratamiento se realizó mediante el método de titulación volumétrica obteniendo porcentajes de degradación de 43.20%, 78.40% y 84.80% a concentraciones de *P.fluorescens* de 10,15 y 20 ppm respectivamente.
- Se logró aislar la cepa *Ps Fluorescens* a través de un minucioso proceso de incubación en caldo peptonado, cultivo en agar cetrimide en el centro de innovación tecnológica Moche.
- Se concluye que se utilizaron diferentes concentraciones de *Ps Fluorescens* (10,15 y 20 ppm), donde la mayor concentración para la degradación de cianuro fue de 20 ppm con una degradación de 84.80%

VI. RECOMENDACIONES

- a. Se recomienda a los investigadores a continuar con esta investigación incluyendo otras variables como temperatura, Ph y otras concentraciones.
- b. Se recomienda a especialistas, biólogos, microbiólogos o biotecnólogos aislar, cultivar, reproducir y conservar *P.fluorescens* en medio seco o liofilizado, para ser utilizado en la degradación de arenas residuales de los procesos de obtención de oro por lixiviación con cianuro.
- c. Se recomienda difundir esta investigación pues ayudaría a informar a investigadores y personas interesadas a continuar con esta investigación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Área de Minas. La Minería y el Cianuro [en línea]. La Edición de La Minería y el Cianuro. UNIVERSIDAD NACIONAL DE JUJUY, Facultad de Ingeniería, Carrera de Ingeniería de Minas. Argentina, Julio 2012.
Disponible en: http://www.academia.edu/7134297/LA_MINER%C3%8DA_Y_EL_CIANUR
[O](#)
2. BLAS, J. Aislamiento y selección de bacterias degradadoras de cianuro a partir de relaves mineros, procedentes de la Sierra del departamento de la Libertad. Tesis (Biólogo Microbiólogo). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. Ciencias biológicas, Perú, 2008.
3. CARDONA, Edwin. Microorganismos Potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro. Tesis (Magister en Medio Ambiente y desarrollo) Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Minas, Departamento de Geo ciencias y Medio Ambiente, 2015.
Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/51440/1/75108346.2016.pdf>
4. Decreto Supremo N° 010-MINAM. Diario Oficial el peruano, Lima, Perú, 21 de agosto del 2010.

5. DÍAZ, Daysi y CONDORI, Ismael. PROCESO DE DETOXIFICACION DE SOLUCIONES CIANURADAS USANDO EL METODO INCO EN EFLUENTES MINEROS. Tesis (título profesional de Ingeniero Químico). Lima: Universidad Nacional de Ingeniería Perú, 2009.
Disponible en http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1020/1/diaz_id.pdf
6. GÓMEZ, Patricia. Degradación de Cianuros mediante Oxidación Química en Efluentes Industriales. Proyecto (Máster de Química y Desarrollo Sostenible). Oviedo: Universidad de Oviedo, departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Junio, 2012.
Disponible en http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/3986/6/TFM_PatriciaGomezLeiva.pdf
7. GUIZA, Leonardo. LA MINERÍA DE HECHO EN COLOMBIA. Defensoría del Pueblo [en línea]. Bogotá, Diciembre de 2010 [Fecha de consulta: 26 de Julio de 2017]
Disponible en: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/F11B784C597AC0F005257A310058CA31/\\$FILE/La-miner%C3%ADa-de-hecho-en-Colombia.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/F11B784C597AC0F005257A310058CA31/$FILE/La-miner%C3%ADa-de-hecho-en-Colombia.pdf)
ISBN 958-958-8571-29-4
8. LOGSDON, Mark, HAGELSTEIN, Karen y MUDDER, Terry. En la publicación en titulada The Management of Cyanide in Gold Extraction. Traducción al español por PAONESSA, Ana. El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro. ICMME (Consejo Internacional de Metales y Medio Ambiente) [en línea] p. 17. [Fecha de consulta: 02 de junio de 2017].
Disponible en: <http://www.panoramaminero.com.ar/ICMME.pdf>
ISBN 1-895720-35-4
9. MAMANI, Oscar. IMPLEMENTACIÓN DE PROCESOS DE DESTRUCCIÓN DE CIANURO CON SULFATO FERROSO Y PEROXIDO DE HIDROGENO. TESIS (Título Profesional de Ingeniero Metalurgista). Lima: Universidad Nacional de Ingeniería del Perú, 2007.
Disponible en http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/795/1/mamani_eo.pdf

10. MERTOL, Alexander y SRECKO, Bernd. A Review on Alternative Gold Recovery Reagents to Cyanide. IME Process Metallurgy and Metal Recycling, RWTH Aachen University, Aachen, Germany, 2016 [Fecha de consulta: 26 de Julio de 2017].

Disponible en: https://file.scirp.org/pdf/MSCE_2016081816514902.pdf

11. MORILLO, Jhonn y GUEVARA, Juan. "Degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas sp.* a dos temperaturas y tres pH". Tesista en la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. REVISTA Científica de Estudiantes [en línea]. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo: Perú, 2015 [Fecha de consulta: 24 de mayo de 2017].

Disponible en <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/892/821.pdf>

12. MUDARRA, J. Efecto del carbón activado de la cascara de coco, reforzado con iones cúpricos, en la remoción de soluciones cianuradas. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental. Universidad Cesar vallejo. TRUJILLO. PERÚ. 2016.

Disponible en http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/6880/mudarra_vj.pdf?sequence=1&isAllowed=y

13. NARANJO, Francisco y SANTA MARÍA, Manuel. EVALUACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* PARA LA BIODEGRADACIÓN DE CIANURO EN SOLUCIÓN ACUOSA. Trabajo de Investigación (título de Ingeniero de Procesos). Medellín: UNIVERSIDAD EAFIT, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS, COLOMBIA, 2006.

Disponible en https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/375/FranciscoJavierNaranjoValencia_2006.pdf;sequence=1

14. Odriozola, V. Campaña de Tóxicos de Greenpeace Argentina. Resumen de impactos ambientales de la minería de oro. No todo lo que es oro brilla.

Greenpeace. Argentina. Enero. 2003. [Fecha de consulta: 26 de Julio de 2017].

Disponible en

<http://www.greenpeace.org/colombia/Global/argentina/report/2006/4/no-todo-lo-que-es-oro-brilla.pdf>

15. RESTREPO, Jaime, MONTOYA, Carlos y MUÑOS, Alexandra. DEGRADACIÓN MICROBIANA DE CIANURO PROCEDENTE DE PLANTAS DE BENEFICIO DE ORO MEDIANTE UNA CEPA NATIVA DE *P.fluorescens* en COLOMBIA. REVISTA DYNA [en línea]. Medellín, Junio de 2006. [Fecha de consulta: 03 de mayo de 2017].

Disponible

en

<http://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/805/1262ISSN-electrónico-2346-2183>

16. SILVESTRE, María. DETOXIFICACIÓN DE AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES DE PLANTAS METALÚRGICAS. TESIS (DOCTORAL). Valencia, Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Politécnica Superior de Alcoy, departamento de Ingeniería Textil y Papelera, Diciembre, 2015.

Disponible

en:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/58988/SILVESTRE%20-%20Detoxificaci%C3%B3n%20de%20aguas%20residuales%20provenientes%20de%20plantas%20metal%C3%BArgicas..pdf?sequence=1>

17. STOLTENOW, Charlie y LARDY, Greg. CYANIDE POISONING. Revista NDSU [en línea]. North Dakota State University, September 2012. [Fecha de consulta: 26 de Junio de 2017].

Disponible

en

<https://www.ag.ndsu.edu/publications/livestock/cyanide-poisoning/v1150.pdf>

18. TUYA, Jonathan. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE CIANURO POR BACTERIAS ALCALOFILAS AISLADAS DE LOS RELAVES DE PLANTA CONCENTRADORA DE METALES MESAPATA CÁTAX – ANCASH. Tesis (Biólogo Microbiólogo Parasitólogo). Lima.: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciencias Biológicas, 2014.

Disponible

en

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3641/1/Tuya_sj.pdf

19. Unidad de Planeación Minero Energético (UPME). MINISTERIO DE MINAS Y ENERGIA. PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA EN LA MINERÍA DEL ORO EN COLOMBIA. MERCURIO, CIANURO Y OTRAS SUSTANCIAS [en línea]. Subdirección de planeación minera Colombia, Bogotá, octubre, 2007. P. 11-12.
Disponibile en http://www.upme.gov.co/docs/mineria_limpia.pdf
ISBN: 978-958-98138-7-4.
20. WHO, David et al. World Health Organization. Hydrogen cyanide and cyanides: Human health aspects. Concise international chemical assessment document, 61. 2006.
21. MINISTERIO DE MINAS Y ENERGIA. Unidad de Planeación Minero Energético (UPME). “PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA EN LA MINERÍA DEL ORO EN COLOMBIA. MERCURIO, CIANURO Y OTRAS SUSTANCIAS” SUBDIRECCIÓN DE PLANEACIÓN MINERA COLOMBIA P. 11-12. 2007.
[ISBN: 978-958-98138-7-4.](#)
22. PERÚ, MINEM. Resolución Directoral N° 025-96-EM/DGAA, aprueba la publicación de las siguientes Guías Ambientales: Guía para el manejo de cianuro y Guía Ambiental para el manejo de reactivos y productos químicos. 09/10/1996.
23. *El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro*, de Mark J. Logsdon, Karen Hagelstein y Terry I. Mudder. Traducido de la publicación en inglés titulada *The Management of Cyanide in Gold Extraction*. Traducción al español: Ana María Paonessa. ICME (Consejo Internacional de Metales y Medio Ambiente) p. 17. 2001.

ANEXOS

ANEXO 1

PROYECTO DE INVESTIGACION				
Efecto de la cepa nativa de <i>P.Fluorescens</i> en la degradación de cianuro en solución, in vitro				
Línea de Investigación				
CALIDAD Y GESTIÓN DE RECURSOS NATURALES				
DATOS GENERALES				
Facultad de Ingeniería	Escuela Académico de Ingeniería Ambiental			Universidad Cesar Vallejo
Departamento	Provincia		Distrito	
La Libertad	Trujillo		Víctor Larco H.	
DATOS DE LA PRUEBA				
Fecha de prueba				
Numero de replicas	3	3	3	3
Concentración <i>P.Fluorescens</i> Ci	0 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm
Tiempo de Exposición	5 días			

Muestra de cianuro en solución M_0		500 ppm							
Grupo de probado		G1		G2		G3		G4	
		Co	M_0	C1	M_0	C2	M_0	C3	M_0
Concentración Promedio \bar{X}_i	Tiempo 5 días								
		\bar{X}_i :		\bar{X}_i :		\bar{X}_i :		\bar{X}_i :	
Degradación Di $D_i = M_0 - X_i$		Do		D1		D2		D3	
Responsable de la prueba		Firma		Verificado por		Firma			
Vargas Alvarez Heyser Jhonatan				Mg. Misael Villacorta González					

FIRMA DEL EVALUADOR

ANEXO 2

MATRIZ DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO

NOMBRE DEL INSTRUMENTO: Matriz de recolección de datos de la tesis:

Efecto de la cepa nativa de *P.Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro

OBJETIVO: Recolectar los datos de la investigación de manera correcta.

DIRIGIDO A: Evaluar el Efecto de la cepa nativa de *P.Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro.

APELLIDOS Y NOMBRES DEL EVALUADOR:

.....

GRADO ACADÉMICO DEL EVALUADOR:

VALIDACIÓN:

ADECUADO: ☐

NO ADECUADO: ☐

FIRMA DEL EVALUADOR

ANEXO 3

MATRIZ DE CONSISTENCIA A JUICIO DE EXPERTO

TITULO: Efecto de la cepa nativa de *P.Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro.

AUTOR: Vargas Alvarez Heyser Jhonatan

Variables	Definición conceptual	Indicadores	Criterio de Evaluación		Observaciones
			Xi	Di	
Concentración de la cepa nativa de <i>P.Fluorescens</i>	Es una noción que describe a la relación, asociación o proporción que se puede establecer al comparar la cantidad de soluto y el nivel de disolvente presentes en una disolución en donde bacterias con forma de bastón, que necesitan oxígeno y nitrógeno para vivir, adaptadas a resistir y vivir en medios cianurados	Cantidad de la cepa nativa <i>Pseudomonas Fluorescens</i> de 0, 10, 15 y 20 ppm.			

	del cual toman el nitrógeno transformando el HCN y CN- en compuesto menos nocivos.			
Degradación de cianuro.	La degradación del cianuro, se refiere a la transformación química del HCN y CN- originando nuevas sustancias con propiedades totalmente diferentes. No tóxicas o menos tóxicas.	se evaluará la solución cianurada después del tratamiento mediante análisis volumétrico y se comparara con la concentración inicial de cianuro $Di = Mo - Xi$		

FIRMA DEL EVALUADOR

ANEXO 4

FICHA TÉCNICA

Ficha de verificación de efecto de la cepa nativa de *P.Fluorescens* en la degradación de cianuro en solución, in vitro

CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Nombre del Instrumento	Ficha de verificación del efecto de la cepa nativa de <i>P.Fluorescens</i> en la degradación de cianuro en solución, in vitro
Autor	Vargas Alvarez Heyser Jhonatan
Procedencia	Escuela de Ingeniería Ambiental de la Universidad César Vallejo. Trujillo
Propósito	Determinar el efecto de la cepa nativa de <i>P.Fluorescens</i> en la degradación de cianuro en solución, in vitro
Forma de Administración	Concentración de <i>P.Fluorescens</i> de 0, 10, 15 y 20 ppm en la solución cianurada de 500 ppm
Numero de Repeticiones	Tres repeticiones por cada concentración
Variables a evaluar	Independiente: de la cepa nativa de <i>P.Fluorescens</i> Dependiente: Degradación de cianuro
Escala de Medición	Cuantitativa de razón

FIRMA DEL EVALUADOR

ANEXO 5

Estadístico Descriptivos

% de degradación

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0 ppm	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
10 ppm	3	42,5333	2,08167	1,20185	37,3622	47,7045	40,20	44,20
15 ppm	3	78,5333	,23094	,13333	77,9596	79,1070	78,40	78,80
20 ppm	3	85,1000	,26458	,15275	84,4428	85,7572	84,80	85,30
Total	12	51,5417	35,40176	10,21961	29,0485	74,0349	,00	85,30

ANOVA

% de degradación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	13777,216	3	4592,405	4121,830	,000
Dentro de grupos	8,913	8	1,114		
Total	13786,129	11			

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: % de degradación

			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
	(I) Concentración P.fluorescens	(J) Concentración P.fluorescens				Límite inferior	Límite superior
Scheffe	0 ppm	10 ppm	-42,53333*	,86185	,000	-45,5435	-39,5232
		15 ppm	-78,53333*	,86185	,000	-81,5435	-75,5232
		20 ppm	-85,10000*	,86185	,000	-88,1101	-82,0899
	10 ppm	0 ppm	42,53333*	,86185	,000	39,5232	45,5435
		15 ppm	-36,00000*	,86185	,000	-39,0101	-32,9899
		20 ppm	-42,56667*	,86185	,000	-45,5768	-39,5565
	15 ppm	0 ppm	78,53333*	,86185	,000	75,5232	81,5435
		10 ppm	36,00000*	,86185	,000	32,9899	39,0101
		20 ppm	-6,56667*	,86185	,001	-9,5768	-3,5565
	20 ppm	0 ppm	85,10000*	,86185	,000	82,0899	88,1101
		10 ppm	42,56667*	,86185	,000	39,5565	45,5768
		15 ppm	6,56667*	,86185	,001	3,5565	9,5768
Bonferroni	0 ppm	10 ppm	-42,53333*	,86185	,000	-45,5316	-39,5351
		15 ppm	-78,53333*	,86185	,000	-81,5316	-75,5351
		20 ppm	-85,10000*	,86185	,000	-88,0983	-82,1017
	10 ppm	0 ppm	42,53333*	,86185	,000	39,5351	45,5316
		15 ppm	-36,00000*	,86185	,000	-38,9983	-33,0017
		20 ppm	-42,56667*	,86185	,000	-45,5649	-39,5684
	15 ppm	0 ppm	78,53333*	,86185	,000	75,5351	81,5316
		10 ppm	36,00000*	,86185	,000	33,0017	38,9983
		20 ppm	-6,56667*	,86185	,000	-9,5649	-3,5684
	20 ppm	0 ppm	85,10000*	,86185	,000	82,1017	88,0983
		10 ppm	42,56667*	,86185	,000	39,5684	45,5649
		15 ppm	6,56667*	,86185	,000	3,5684	9,5649

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

% de degradación

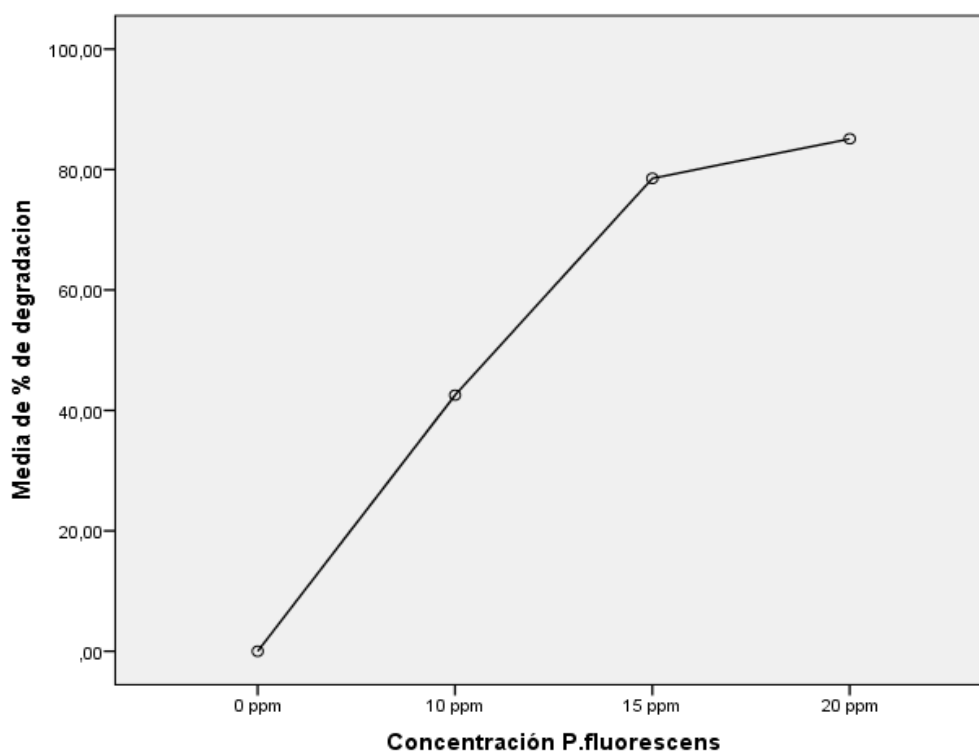
	Concentración P.fluorescens	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
Scheffe ^a	0 ppm	3	,0000			

10 ppm	3	42,5333		
15 ppm	3		78,5333	
20 ppm	3			85,1000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráficos de medias



PRUEBA DE NORMALIDAD

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a	Shapiro-Wilk
--	---------------------------------	--------------

	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% de degradación	,276	12	,052	,805	12	,061

a. Corrección de significación de Lilliefors

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

% de degradación

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
8,654	3	8	,07

Tabla N° 7

	RANGO DE CONCENTRACIÓN Miligramos por litro (mg/L)^s
Cianuro total	50-2,000
Arsénico	0-115
Cobre	0.1-300
Hierro	0.1-100
Plomo	0-0.1
Molibdeno	0-4.7
Níquel	0.3-35
Zinc	13-740

Scott, J. S., *Status of Gold Mill Waste Effluent Treatment*, Informe para CANMET, Recursos Naturales Canadá, Marzo de 1993. ICME. Citado por Paonessa (2001, p. 17)

Tabla N° 8


**NIVELES MAXIMOS PERMISIBLES DE EMISION PARA
LAS UNIDADES MINERO-METALURGICAS**

PARAMETRO	VALOR EN CUALQUIER MOMENTO	VALOR PROMEDIO ANUAL
ph	Mayor que 6 y Menor que 9	Mayor que 6 y Menor que 9
Sólidos suspendidos (mg/l)	50	25
Plomo (mg/l)	0.4	0.2
Cobre (mg/l)	1.0	0.3
Zinc (mg/l)	3.0	1.0
Fierro (mg/l)	2.0	1.0
Arsénico (mg/l)	1.0	0.5
Cianuro total (mg/l) *	1.0	1.0

* CIANURO TOTAL, equivalente a 0.1 mg/l de Cianuro Libre y 0.2 mg/l de Cianuro fácilmente disociable en ácido.

Fuente: www.fonamperu.org/general/pasivos/documentos/imps_efluentes.pdf

ANEXO 6


[Regístrate](#)
[Olvide mi contraseña](#)
[Ingresar](#)

[Vademecum](#)
[EcoVad](#)
[Vad MX](#)
[Noticias](#)
[Revistas](#)
[Agrolinks](#)


Formulados con




PSEUDOMONAS FLUORESCENS cepa GR-322


Comercializadoras de

PSEUDOMONAS FLUORESCENS cepa GR-322

*** PSEUDOMONAS FLUORESCENS cepa GR-322**
1x106 Ufc/g. SP (Biofertilizantes)






Información técnica Actualizada sobre productos Fitosanitarios y Nutricionales para la agricultura convencional y orgánica, noticias y empresas del sector.

MANEJO DE FITOSANITARIOS >

PRIVACIDAD >


ACERCA DE ... >

Últimas Noticias



STOLLER EUROPE PARTICIPARA POR CUARTO AÑO CONSECUTIVO EN FRUIT ATTRACTION


2017-09-21 00:00:00 UTC




Seipasa, finalista en los premios Agrow Awards 2017

2017-09-19 00:00:00 UTC

Agrolinks




STOLLER EUROPE
STOLLER EUROPE Pol. Ind. Plá de la Vallonga, Alisios, 24 03006 Alicante Tl 96 511 05 22 / Fax 96 520 81 20 C.e...



FERTIBERIA
FERTIBERIA, Pº de la Castellana, 259 D - Torre Espacio, Planta 48 28046 Madrid Tl 91 586 62 00 / Fax

Últimas Revistas



Fuente: www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/view_composition?book_id=1&composition_id=5377

ANEXO 7

Degradación de cianuro con *Pseudomonas Fluorescens*

Según MORENO, (2014) Las bacterias son microorganismos muy versátiles que pueden degradar una gran variedad de compuestos naturales y xenobióticos, y el cianuro no es una excepción ya que puede ser utilizado por algunas estirpes bacterianas como una fuente de nitrógeno para el crecimiento. Para que un organismo pueda asimilar cianuro, convirtiendo esta sustancia potencialmente letal en un nutriente o alimento (“cianotrofia”), tienen que darse una serie de requerimientos previos.

- En primer lugar, el organismo cianotrofo debe tener una respiración insensible al cianuro, lo que requiere una oxidasa alternativa a la citocromo c oxidasa.
- En segundo lugar, debe producir sideróforos o sistemas de captación de hierro, ya que la biodisponibilidad de este metal es muy baja en medios con cianuro debido a su elevada afinidad por los metales, con los que forma complejos muy estables.
- Finalmente, se requiere una ruta bioquímica que permita la transformación del cianuro en amonio, un compuesto nitrogenado fácilmente asimilable.

La *Pseudomonas* son unas bacterias que crece en condiciones alcalinas (pH 9-10) utilizando cianuro, cianato, diferentes nitrilos (cianuros orgánicos) y algunos complejos cianuro-metálicos como única fuente de nitrógeno.

La caracterización molecular del proceso de asimilación del cianuro ha revelado que en estas bacterias la tolerancia al cianuro está directamente relacionada con el mecanismo bioquímico de degradación. La oxidasa alternativa que permite la respiración insensible a cianuro está asociada a una malato:quinona oxidoreductasa que convierte el malato en oxalacetato, y éste reacciona químicamente con el cianuro para formar una cianhidrina (nitrilo) que finalmente produce amonio por la acción de la nitrilasa NitC

Los estudios proteómicos han demostrado que estas bacterias responde al cianuro induciendo una serie de proteínas implicadas en los mecanismos de adquisición de hierro, de regulación del metabolismo por carencia de nitrógeno y

de defensa frente a estrés oxidativo. Recientemente se ha secuenciado el genoma de esta estirpe, el primero que se completa en organismos cianotróficos, lo que ha confirmado el gran potencial biotecnológico de esta bacteria para la detoxificación de cianuro y residuos industriales cianurados, y también para la degradación de otros contaminantes.

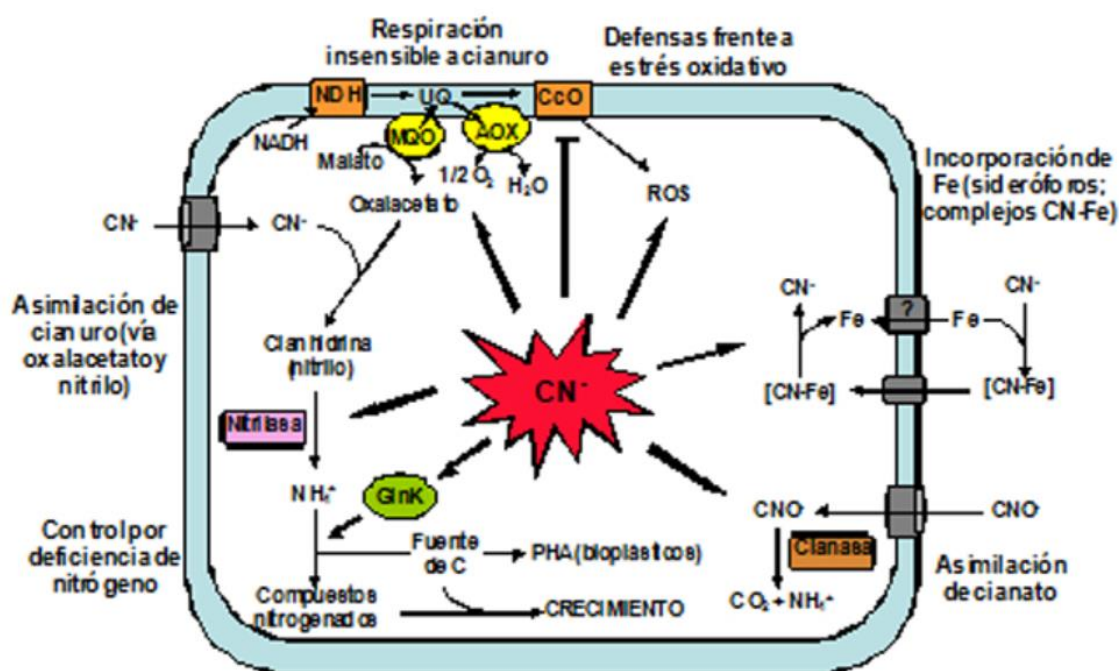


Fig. Nº 7 Respuesta al cianuro en *Pseudomonas*

En la Fig. Nº 7 nos muestra El cianuro inhibe la citocromo c oxidasa (CcO), lo que genera estrés oxidativo y desencadena mecanismos de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS), pero induce la oxidasa alternativa (AOX) y la malato:quinona oxidorreductasa (MQO) para mantener la respiración aeróbica (NDH, NADH deshidrogenasa; UQ, ubiquinona). El oxalacetato generado por la MQO se une al cianuro formando una cianhidrina, que es asimilada mediante una nitrilasa. Esto permite utilizar el cianuro como fuente de nitrógeno para el crecimiento. El cianato es asimilado por la cianasa, enzima que también se induce por cianuro. Otras respuestas son la inducción de sistemas de incorporación de hierro y/o complejos cianuro-Fe y la activación del sistema de regulación metabólica por deficiencia de nitrógeno. Además, durante el crecimiento con cianuro la bacteria puede acumular polihidroxialcanoatos (PHA), polímero utilizable para fabricar bioplásticos.

Procedimiento de concentración de *P. fluorescens* y cianuro de sodio

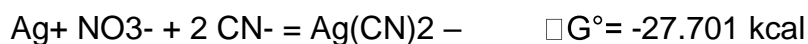
Se pesó en la balanza analítica con precisión de 10, 15 y 20 mg de *Pseudomonas Fluorescens* liofilizadas las cuales se disolvieron hasta un litro de solución en agua destilada y esterilizada.

Se preparó la solución cianurada con cianuro de sodio al 100% de pureza, preparando primero agua destilada a un pH de 10 (solución – NaOH 5%) en el cual se disolvió 892 mg de cianuro de sodio, obteniendo una concentración de 500 ppm en cianuro CN^- .

A esta solución de cianuro se le agrego soluciones de 10, 15 y 20 ppm respectivamente de *Pseudomonas Fluorescens*, previamente preparadas.

Análisis de cianuro libre

La técnica utilizada es la reacción del nitrato de plata con el ion cianuro en solución alcalina pH 10.5, ASTM D-2036-91, para formar el complejo soluble $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ – según la reacción:



Cuando no queda más cianuro en solución, el exceso de plata reacciona con el indicador (KI) para formar AgI. El punto final de la titulación se determinó cuando aparece la primera opalescencia permanente de una niebla azulosa que ofusca la brillantez original de la solución.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CIANURO EN SOLUCIONES

Introducción:

El método está basado en la reacción entre el cianuro libre y el nitrato de plata.
 $\text{AgN} + 2\text{NaCN} = \text{NaAg}(\text{CN})_2$ 169.88 + 98.02 = 267.90 1.7332 gr de AgNO_3 reaccionan con 1 gr de NaCN

1 gr/L de NaCN debe consumir 200 mL de solución de AgNO_3 con concentración de 8.5 gr/L.

50 mL de la solución de NaCN con concentración de 1 gr/L debe consumir 10 mililitros de la solución de AgNO₃ con concentración de 8.5 gramos por litro.

Es decir cada mililitro de solución de AgNO₃ gastado equivale a una concentración de NaCN de 0.01%

Objetivo: Conocer y experimentar con el método del nitrato de plata que se aplica en la industria y en el laboratorio para determinar el cianuro que permanece libre en una solución Equipo y material que se utiliza:

1. Balanza analítica
2. Bureta graduada de 50 mL
3. Probeta graduada de 50 mL.
4. Matraz Erlen Meyer de 125 mL
5. Vasos de precipitados
6. Nitrato de plata Q.P. (Químicamente puro)
7. Solución de cianuro de sodio con concentración de 0.1% (1 gr/L)
8. Ioduro de potasio KI.

Procedimiento:

1. La solución de nitrato de plata se prepara disolviendo 8.5 gr de la sal en agua destilada hasta hacer 1 L.
2. Se toman 100 mL de la solución de cianuro por analizar que debe estar bien clarificada y se colocan en el matraz Erlen Meyer de 125 mL.
3. Se titula con la solución de nitrato de plata, debiendo observar cuidadosamente cada adición de nitrato, permitiendo que la nube blanca-azulosa que se forma permanezca algunos segundos antes de agitar el matraz y disolverla. El punto final se alcanza cuando después de agitar el matraz, aparece la primera opalescencia permanente de una niebla azulosa que ofusca la brillantez original

de la solución. El punto final quiere decir que ya no existe cianuro libre en la solución por haber reaccionado con el nitrato de plata.

Resultados:

Anotar el gasto de la solución de AgNO_3 gastados en la titulación y finalmente se procedió a calcular la concentraciones de cianuro según las siguientes formulas. MUDARRA, (2016).

$$\% \text{NaCN} = \text{Factor} \times \text{Gasto de } \text{AgNO}_3 \text{ (ml)}$$

$$\% \text{CN}^- = \% \text{NaCN} \times \frac{26 \times 10000}{49} = \text{ppm CN}^-$$

Donde:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Normalidad (AgNO}_3) \times 98 \times 100}{1000 \times \text{Volumen de la solución tomada (ml)}}$$

$$\text{Normalidad} = \frac{\text{AgNO}_3 \text{ (gr) que se usa para preparar en 1 L de solución}}{\text{Peso Molecular AgNO}_3}$$

Observaciones: 1. En esta práctica se está valorando una solución fresca de cianuro. 2. En la práctica siguiente se determinará la concentración de cianuro en soluciones de mineral que ya ha sido lixiviado, en este caso la concentración de cianuro que se determine será menor por el cianuro que consume el mineral.

ANALISIS VOLUMETRICO DE CIANURO

Items	Concentración de Cianuro (Mo)	Muestra solución a titular	Volumen gastado AgNO_3 0.05 N	Factor	% NaCN	% CN^- Ppm \bar{X}_I	Degradación $D_i = Mo - \bar{X}_I$
0 pm	500 ppm	100 ml	19.23 ml	0.0049	0.094227	500	0

10 pm			10.93 ml		0.053557	284	216
15 pm			4.45 ml		0.020335	108	392
20 pm			2.92 ml		0.014308	76	424

Tabla N° 9: degradacion de cianuro con las concentraciones 0,10, 15, 20 ppm.

Se preparó 200 ml de solución titulante de nitrato de plata 0.05 N, disolviendo 1.70 gr d AgNO₃ y disolviendo hasta los 200 ml con agua destilada.

Se llenó la bureta hasta 50 ml con la solución de nitrato de plata, se tomó 100 ml de la solución de cianuro de sodio a los cinco días de incubación con *P. Fluorescens*, utilizando como indicador Ioduro de potasio, KI. Los datos obtenidos y calculados se muestran en la tabla.

Cálculos:

Paso 1.

$$\text{Normalidad} = \frac{\text{AgNO}_3(\text{gr}) \text{ que se usa para preparar en 1 L de solucion}}{\text{Peso Molecular AgNO}_3}$$

$$\text{Normalidad} = \frac{8.5 \text{ gr}}{169.87 \text{ gr/mol}}$$

$$\text{Normalidad} = 0.05 \text{ N}$$

Paso 2.

$$\text{Factor} = \frac{\text{Normalidad (AgNO}_3) \times 98 \times 100}{1000 \times \text{Volumen de la solucion tomada (ml)}}$$

$$\text{Factor} = \frac{0.05 \times 98 \times 100}{1000 \times 100}$$

$$\text{Factor} = 0.0049$$

Por lo tanto en:

➤ 0 ppm

$$\% \text{NaCN} = \text{Factor} \times \text{Gasto de AgNO}_3 \text{ (ml)}$$

$$\% \text{NaCN} = 0.0049 \times 19.23$$

$$\% \text{NaCN} = 0.094227$$

$$\% \text{CN}^- = \% \text{NaCN} \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 0.094227 \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 500 \text{ ppm CN}^-$$

➤ 10 ppm

$$\% \text{NaCN} = \text{Factor} \times \text{Gasto de AgNO}_3 \text{ (ml)}$$

$$\% \text{NaCN} = 0.0049 \times 10.93$$

$$\% \text{NaCN} = 0.053557$$

$$\% \text{CN}^- = \% \text{NaCN} \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 0.053557 \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 284 \text{ ppm CN}^-$$

➤ 15 ppm

$$\% \text{NaCN} = \text{Factor} \times \text{Gasto de AgNO}_3 \text{ (ml)}$$

$$\% \text{NaCN} = 0.0049 \times 4.45$$

$$\% \text{NaCN} = 0.020335$$

$$\% \text{CN}^- = \% \text{NaCN} \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 0.020335 \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 108 \text{ ppm CN}^-$$

➤ 20 ppm

$$\% \text{NaCN} = \text{Factor} \times \text{Gasto de AgNO}_3 \text{ (ml)}$$

$$\% \text{NaCN} = 0.0049 \times 2.92$$

$$\% \text{NaCN} = 0.014308$$

$$\% \text{CN}^- = \% \text{NaCN} \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 0.014308 \times \frac{26 \times 10000}{49}$$

$$\% \text{CN}^- = 76 \text{ ppm CN}^-$$

ANEXO 8

Procedimiento para el aislamiento e identificación de *Pseudomonas Fluorescens*.

Los microorganismos *Pseudomonas Fluorescens*, han encontrado la habilidad para subsistir en medios cianurados tomando el nitrógeno del cianuro para su metabolismo, degradando de esta manera a las sustancias peligrosas HCN, CN⁻ en otras más sencillas y menos tóxicas.

Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* se aislaron de arenas y tierras descartadas del proceso de extracción de oro por cianuración del cerro “El Toro”, Huamachuco, disolviendo 100 gramos con agua destilada estéril, agitando durante 1 hora y dejando reposar 5 minutos. De esta solución se filtró y extrajo 10 ml y se disolvieron con 90 ml de caldo peptonado, dejando incubarse durante 60h a una temperatura de 32°C.

Después de la incubación de las *Pseudomonas fluorescens* en caldo peptonado se realizó el cultivo y aislamiento en agar nutritivo agar con soya y trip-caseína para el desarrollo de las colonias. Posteriormente se identificaron las colonias formadas luego de incubación por 48 horas a 32 °C en una estufa. Al inicio se procedió a hacer una coloración de Gram. Los bacilos Gram-negativos son los que se seleccionaron para los aislamientos. Los mismos que fueron sembrados en agar Cetrimide y se seleccionaron las que tuvieron un crecimiento moderado o crecimiento normal, sin producción existente de pigmentos de color verde y café. Las colonias que coincidieron con los resultados mencionados anteriormente, se estimaron como *Pseudomonas fluorescens*.

- Hervir el agua destilada para obtenerla en agua destilada estéril.



- Dejas enfriar por unos 15 minutos.



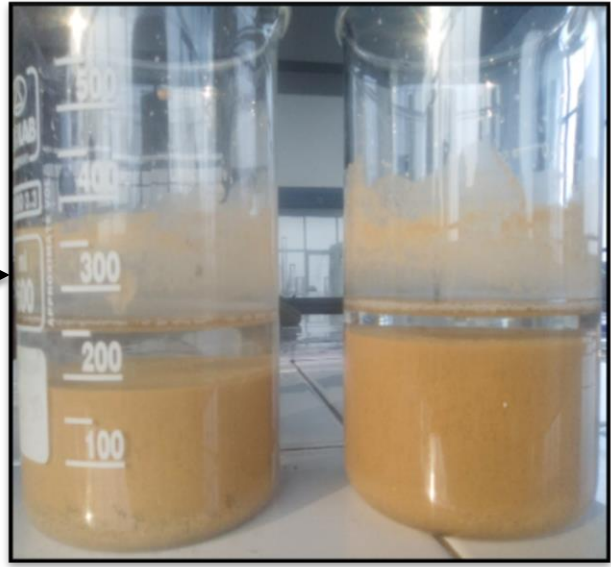
- Pesar la tierra de descarte de la extracción de oro 100 gr.



- Disolver los 100 gr con 200 ml de agua destilada estéril.



- Agitar durante 1 hora y dejar reposar 5 minutos.



- Se extrajo 10 ml de la solución clarificada y se disolvió en 90 ml de caldo peptonado.



Preparación del caldo peptonado:

- Peptona: 1 gr
- Cloruro de Sodio: 8.5 gr
- Agua: 1L

Para 0.6 L de agua.



$$x = \frac{0.6 L \times 1 gr}{1 L}$$

$$x = 0.6 gr de peptona$$



$$x = \frac{0.6 L \times 8.5 gr}{1 L}$$

$$x = 5.1 gr de Cianuro de Sodio$$

❖ Preparación de 0.6 L

Disolver los componentes en los 0.6 L de agua y ajustar pH a 7 con Cloruro de Sodio.

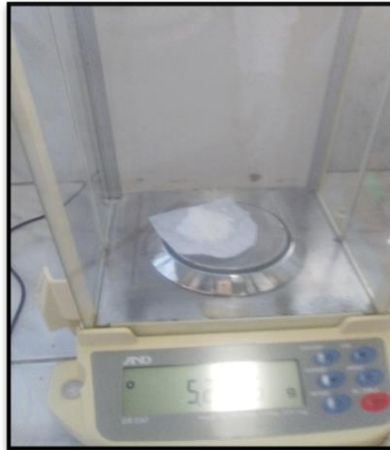
Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Después de esterilización y el pH deben ser iguales a los iniciales.

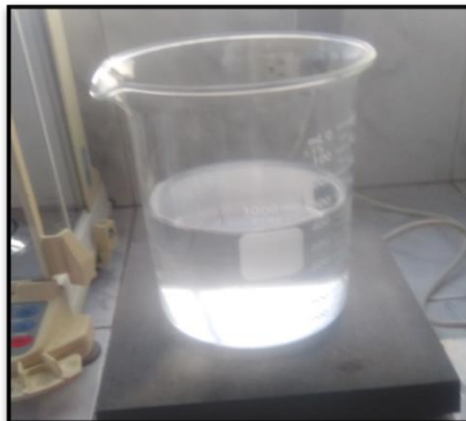
- Peso de Peptona: 0.6 gr.



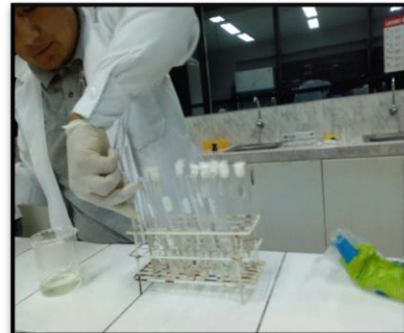
- Peso de Cloruro de Sodio: 5.1 gr.



- Se disolvió todos los componentes y ajustar un pH a 7 con Cloruro de Sodio, luego esterilizar a 121 °C por 15 minutos.



- Luego de obtener el caldo peptonado se extrajo de la solución clarificada 10 ml en 90 ml de caldo peptonado, luego se extrajo de esta solución 10 ml y se filtró en tubos de ensayo.



- Luego se dejó incubar durante 60h a una temperatura de 32°C.
- Identificación de *Pseudomonas Fluorescens*.



- Concentración de Cianuro.

